

Detección y aislamiento del Parvovirus porcino en Medellín, Colombia.

Silvia Rico¹, MV,Esp ; Sadoh Molina¹, MV ; Francisco Pabón², MV.

Grupo Centauro, Línea Enfermedades Infecciosas de los animales.

¹Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia; ²Laboratorio de Sanidad Agropecuaria, convenio - Secretaría de Agricultura y Universidad de Antioquia, AA 1226 Medellín, Colombia.
silviarg@agronica udea.edu.co

(Recibido: 30 octubre, 2001; aceptado: 28 enero, 2003)

Resumen

Con el objetivo de detectar y aislar el Parvovirus porcino (PVP), se analizó el tejido pulmonar de 75 fetos porcinos momificados, procedentes de granjas de Medellín, por la técnica de Hemaglutinación (HA) con glóbulos rojos de cobayo y la propagación del virus en cultivos de la línea celular PK15 de riñón porcino. Los fetos presentaron un tamaño entre 8 y 25 cm. El 73.3% (55/75) de los fetos resultó positivo y 26.7% (20/75) negativo a la HA. El 93.54% (52/55) de los fetos positivos eran de 45 a 65 días de gestación y el 6.46% (3/55) eran de 66 a 75 días de edad; en cuanto a los casos negativos el 90% (18/20) era mayor de 76 días y 10% (2/20) de 66 a 75 días de edad. El aislamiento viral fue posible a partir de dos de los fetos positivos a HA 3.6% (2/55) de una edad estimada de 48 y 51 días respectivamente. Luego de su propagación en la línea celular PK15, se determinó un incremento en el título del virus medido por HA y su resistencia al tratamiento con éter al 20%, así como su estabilidad a pH 3.0 a 9.0 y formación de cuerpos de inclusión intranucleares. Adicionalmente, se concluyó que el PVP afectó un alto porcentaje de los fetos analizados y que el diagnóstico por HA de la infección con el virus presentó mayores títulos del antígeno viral en fetos de menos de 65 días de edad (17 cm de tamaño).

Palabras clave: cerdos, cultivo celular, diagnóstico, hemaglutinación, reproducción, virus.

Introducción

El Parvovirus porcino (PVP) es un agente viral asociado a fallas reproductivas, las epidemias de parvovirus en las granjas porcinas se manifiestan por disminución en la tasa de concepciones, incremento en la frecuencia de fetos momificados y en el número de mortinatos, lo que representa en conjunto reducción del tamaño de la camada (8,9,27). Huysman *et al* (20), reportan que en una granja afectada en forma enzoótica la disminución en el número de cerdos puede alcanzar valores de 0.4 a 2.36 cerda/año ó 0.26 a 1.82 primeriza/año. Además, las pérdidas monetarias asociadas a las fallas reproductivas por PVP estimadas por Gardner *et al* (13,36), son \$10.85 dólares por cerdo, y se relacionan con el estado de seropositividad de las granjas.

Las características del PVP, lo ubican en la familia Parvoviridae, por tener genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena sencilla y cápside icosaédrica de 18 a 26 nanómetros aproximadamente. El virus presenta tres proteínas estructurales denominadas VP1, VP2 y VP3 ; la VP2 posee propiedades hemoaglutinantes, principalmente de glóbulos rojos de cobayo, rata, pollo, gato y del grupo "O" humano (2,26). Para su propagación el PVP requiere células en proceso activo de división; su estudio en el laboratorio se ha realizado con cultivos de tejidos de origen porcino (2,21,40). El virus se ha identificado en muchas regiones y algunas cepas aisladas de éste se han denominado, NADL-2, KBSH, Kresse y NADL-8 (6,34). El virus se halla ampliamente distribuido en el mundo, presentándose

en Estados Unidos, Inglaterra, Alemania, Austria, Japón, México y Panamá entre otros (11,25,35). La difusión del PVP se realiza en forma horizontal y las hembras susceptibles lo adquieren principalmente por vía oronasal, aunque también se difunde vía venérea, transplacentaria e intrauterina (3,18,42). El virus es viable a pH entre 3.0 y 9.0, resistente al éter y cloroformo y puede permanecer activo en el ambiente hasta por 14 semanas (22,26,38).

En Colombia la PVP se considera una enfermedad endémica relacionada con problemas reproductivos en explotaciones porcinas intensivas; la prevalencia a nivel nacional varía desde 40 a 58.6% con un promedio de 49.7% en investigaciones realizadas por González G y Torres M en 1986 y 1987 (15,16,17). En estudios epidemiológicos de la enfermedad en el departamento de Antioquia - Colombia, se determinó la prevalencia de 49.42 y 82.56% en los municipios de Turbo y Andes, respectivamente (32,33), y en el Municipio de la Unión 59.29%, adicionalmente se estableció como enzoótica a nivel de granjas afectadas en La Unión y Barbosa en 1995 (1,37).

Para el diagnóstico de las infecciones con PVP, los métodos serológicos se consideran de poco valor, aunque se emplean con frecuencia para conocer el estado inmunológico de una piara y la protección contra el virus (19,31,41). El diagnóstico definitivo de la etiología viral en fallas reproductivas requieren la identificación de éste en los tejidos de los fetos, lechones mortinatos o neonatales (25,31). En Medellín - Antioquia, dónde se ha determinado por serología la presencia de anticuerpos contra el PVP, no se tienen reportes de su aislamiento ; por lo tanto surgió la necesidad de confirmar la infección y para ello, adecuar la técnica de HA para identificar el antígeno viral, así como su cultivo en la línea celular PK15.

Materiales y métodos

En esta investigación se adecuaron técnicas como la HA para la identificación del antígeno del PVP y el aislamiento viral en cultivo de células de la línea PK15 (de riñón porcino), en el Centro de Sanidad Agropecuaria, convenio entre la Secretaría de Agricultura y la Universidad de Antioquia.

En este estudio se recibieron y analizaron 75 momias porcinas procedentes de cuatro granjas tecnificadas de cría, con un promedio de 400 cerdas e

historia de seropositividad a PVP, localizadas en el municipio de Medellín, Antioquia - Colombia. Las momias se conservaron en congelación hasta el momento de su necropsia, en la cual se determinó la edad en días a cada una de ellas, mediante de la siguiente ecuación: longitud(3)+21 reportada por Romero *et al* (39) y se registraron en grupos de edad de 45 a 55 días, 56 a 65 días, 66 a 75 días, 76 a 85 días, 86 a 95 y 96 a 105 días. Posteriormente se tomaron fragmentos de 2cc de tejido pulmonar de las momias, los cuales se maceraron con arena estéril, y se mezclaron con solución salina buferada en una proporción de 1:10. Esta mezcla se centrifugó a 2000rpm durante 15 minutos, luego se depositaron los sobrenadantes en crioviales y se conservaron en congelación.

Para la detección del antígeno viral en los sobrenadantes se realizó la prueba de hemoaglutinación (HA) descrita por Joo HS *et al* (23), con albúmina sérica bovina al 0.2% en solución salina fisiológica y glóbulos rojos de Cobayo al 0.5% ; se utilizaron micro platos de 96 pozos de fondo en "U", se realizaron diluciones dobles de 1 :2 hasta 1 :2048 ; registrándose el recíproco del título mayor en el cual hubo HA.

El aislamiento viral se realizó en células de la línea PK15 (Porcine Kidney - Riñón porcino, donadas por el Instituto Colombiano Agropecuario, ICA -Santa fé de Bogotá), cultivadas a 37°C en medio RPMI (SIGMA), suplementado al 1% con penicilina, estreptomina (SIGMA), anfotericina (SIGMA), vitaminas (SIGMA), Glutamina (SIGMA) y Suero Fetal Bovino (SFB, SIGMA) al 10%, en botellas de 25cm² (SIGMA). Adaptación de la técnica descrita por Thacker et al y Falcon et al (11,42). El SFB se analizó y se halló libre de anticuerpos contra el PVP, con la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH) descrita por Joo HS et al y Mengeling (24,30), en micro platos de 96 pozos de fondo en "U", el SFB se trató a 56°C por 30 minutos y con Kaolin al 25% por 20 minutos, luego se enfrentó a 4 UHA (unidades hemoaglutinantes) del antígeno viral, y glóbulos rojos de cobayo al 0.5%. El medio de cultivo de las células se analizó por la técnica de HA antes de ser tratado con los sobrenadantes del tejido pulmonar de las momias, para asegurar su negatividad al PVP y cuando la monocapa presentaba 50 a 70% de confluencia, se removía el medio de crecimiento antes de inocular 1 mL de sobrenadante a cada botella, el cual se dejaba adsorber

durante 1 hora, luego de la cual se adicionaba medio nuevo. A las 72 horas de la inoculación, el medio de cultivo se analizaba por actividad HA y las células se coloreaban con cristal violeta para observar la presencia o no de cuerpos de inclusión intranucleares, si resultaban negativos se realizaban dos pases ciegos, considerando el aislamiento negativo, si al tercer pase había ausencia de cuerpos de inclusión y HA negativa.

En los cultivos positivos a HA y cuerpos de inclusión, las células se colectaron y lisaron por dos ciclos de congelación y descongelación, luego se centrifugaron a 2000rpm, durante 15 minutos y se caracterizó el virus por la técnica descrita por Falcon *et al* y Foni *et al* (11,12) al tratar el sobrenadante durante siete horas a 4°C con éter (volumen a volumen) y a pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 y 9.0; posteriormente, se observó la actividad HA y cultivó de nuevo en la línea celular PK15.

Resultados

Las momias porcinas analizadas presentaron tamaños entre 8 y 25 cm, lo cual corresponde a edades entre 45 y 96 días; con un 76% (57/75) de un tamaño menor a 16 cm (69 días de edad) y 24% (18/75) mayor de 70 días de edad. El antígeno viral detectado por HA, fue positivo en el 73.3% (55/75) de los sobrenadantes de pulmón de las momias, de los cuales el 93.54% (52/55) era de 45 a 65 días de edad y el 6.46% (3/55) de 66 a 75 días; el 26.7% (20/75) negativo a PVP era de 66 a 95 días, con un 90% (18/20) mayor de 76 días y 10% (2/20) de 67 días de edad (véase Tabla 1). Los títulos positivos a HA de los sobrenadantes variaron desde 1:16 a 1:2048; de los cuales en los fetos menores de 55 días el 79.3% (23/29) correspondió a títulos mayores a 1:128, en los fetos de 56 a 65 días de gestación el 74% (16/23) a títulos menores de 1:128 y en los de 66 a 75 días de gestación el 100% (5/5) fue menor a 1:64 (véase Tabla 2).

El aislamiento viral fue posible en un 3.6% (2/55) a partir de los sobrenadantes de pulmón de dos fetos de

48 y 51 días de edad con un título de HA inicial de 1:512; el cual a los cinco días de inoculado al cultivo fue 1:1024 y 1:2048; además las células presentaron cuerpos de inclusión observados con la tinción Cristal Violeta. Posterior al tratamiento con éter y pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 y 9.0 y siguiente pase celular la HA fue 1:2048, para ambos cultivos e igualmente algunas células presentaron cuerpos de inclusión intranucleares.

Discusión

La gran cantidad de fetos momificados de 45 a 65 días de edad 76% (57/75) hallado en esta investigación, puede estar relacionado con la inmadurez inmunológica de éstos, lo cual los hace más susceptibles a diferentes factores infecciosos y no infecciosos durante este período de gestación (7).

La causa probable de la muerte del 73.3% (55/75) de los fetos analizados es el PVP, por la identificación del antígeno viral en los sobrenadantes de tejido pulmonar de éstos, por medio de la HA, la cual se considera suficientemente confiable, sensible y específica para el diagnóstico de la PVP (23, 4). Este porcentaje de la presencia del virus en este estudio coincide con los realizados en fetos obtenidos en plantas de sacrificio por Mengeling *et al* y Romero *et al* (29,39), quienes encontraron 79% y 43.7%, de positividad con HA, respectivamente y confirmaron con ello la capacidad del virus de provocar una infección intrauterina y ser una causa común de muerte fetal porcina.

La muerte en los casos donde la HA resultó negativa, se pudo dar por otros agentes no determinados en esta investigación o por la producción de anticuerpos inhibidores de la HA contra el virus en fetos de más de 70 días de gestación, los cuales se consideran inmunológicamente competentes según lo reportado por Thacker *et al* (43), edad presente en el 100% (20/20) de los casos negativos en el estudio. Para identificar el antígeno del PVP en estos casos,

Tabla 1. Distribución de casos positivos y negativos a HA con relación a la edad de los fetos porcinos.

| Edad (días) | 45 a 55 | 56 a 65 | 66 a 75 | 76 a 85 | 86 a 95 | 96 a 105 | Total |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|-------|
| Positivos | 29 | 23 | 3 | | | | 55 |
| Negativos | | | 2 | 11 | 4 | 3 | 20 |
| Total | 29 | 23 | 5 | 11 | 4 | 3 | 75 |

Tabla 2. Relación de los títulos de HA con la edad de los fetos porcinos.

| Título HA/50 μ l | 45 a 55 | 56 a 65 | 66 a 75 | 76 a 85 | 86 a 95 | 96 a 105 | Total |
|----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|-------|
| 0 | | | 2 | 11 | 4 | 3 | 20 |
| 16 | 3 | 6 | 2 | | | | 11 |
| 32 | 2 | 3 | | | | | 5 |
| 64 | 1 | 4 | 1 | | | | 6 |
| 128 | 7 | 3 | | | | | 10 |
| 256 | | 5 | | | | | 5 |
| 512 | 5 | 2 | | | | | 7 |
| 1024 | 5 | | | | | | 5 |
| 2048 | 6 | | | | | | 6 |
| Total | 29 | 23 | 5 | 11 | 4 | 3 | 75 |

Waldvogel (44), recomienda la inmunofluorescencia indirecta como ayuda diagnóstica. Adicionalmente, el alto porcentaje de casos positivos 93.54% (52/55) correspondientes a fetos menores de 70 días de edad, apoya lo recomendado por Mengeling y el Instituto Colombiano Agropecuario (10,25,31), sobre la necesidad de fetos menores de 17cm o sus pulmones para la identificación del PVP por HA.

Según Mengeling (25,28), la detección del antígeno viral a partir del sobrenadante de tejido pulmonar de fetos muertos varias semanas antes del parto de las cerdas, enfatiza la gran estabilidad del antígeno del PVP, la cual es más perdurable que su infectividad; esto se pudo observar con el 73.3% de identificación del virus con la HA y los pocos aislamientos realizados (3.6%). Con respecto a lo anterior Romero *et al* (39) reporta que la HA se puede presentar con partículas virales vacías en las cuales se conserve la VP2, y Choi *et al* (5,6) determinó la inhibición de la replicación del PVP en cultivo celular por la presencia de este tipo de partículas, la dependencia de algunos tipos de PVP a temperaturas

tan altas como 39°C; además Falcon *et al* y González D. (11,14) reportan el requerimiento del virus por cultivos celulares primarios; en la presente investigación se empleo la línea celular PK15 a 37°C.

El virus aislado a partir de los sobrenadantes de tejido pulmonar de dos de los fetos porcinos positivos a HA, se identificó como PVP, por su capacidad de HA de glóbulos rojos de cobayo, efecto citopático en la línea celular PK15 observado con la tinción Cristal Violeta, además de las características químicas exhibidas como son conservar su poder infectante luego del tratamiento con éter y pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, y 9.0; las cuales son algunas de las principales propiedades del virus reportadas por Mengeling, Falcon *et al* y Foni *et al* (11,12,26).

Se recomienda continuar con el estudio del PVP en Medellín - Antioquia con miras a determinar el tipo o tipos de cepas presentes en nuestro medio, lo cual es de gran utilidad para enfrentar y controlar la infección con el virus y poder disminuir su impacto en la porcicultura de la región.

Agradecimientos

Al personal de las granjas porcinas que colaboraron en la conservación y envío de los fetos momificados, a los veterinarios y bacteriólogas del Laboratorio de virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia por su acompañamiento e instrucción constante en el proceso, al Laboratorio del ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) por su aporte de la línea celular PK15, a las bacteriólogas y auxiliares del Centro de Sanidad Agropecuaria convenio de la Universidad de Antioquia y Secretaría de Agricultura de Antioquia por su atenta disposición y a las entidades financiadoras, Universidad de Antioquia, Secretaría de Agricultura y el CODI (código del proyecto #38).

Summary

Detection and isolation of Porcine Parvovirus in Medellín, Colombia.

The objective of this study was to detect the viral antigen and isolate the porcine parvovirus (PVP). Supernatants of lung tissue of 75 dead porcine fetuses from selected farms in Colombia were studied by Haemagglutination assay (HA) and viral propagation in PK15 cell culture (Porcine Kidney). The fetuses had a crown rump length between 8 to 25cm. 73.3% (55/75) of the fetuses were positive to HA and the 93.54% (52/55) of the positive cases were 45 to 65 days old while the 6.46% (3/55) were 66 to 75 days old. The 26.7%(20/75) of the cases were negative to HA. The 90% (18/20) of the negative cases, were 66 to 95 days old. The virus was isolated from two mummies positives to HA, 3.6%(2/55), which were 48 and 51 days old, respectively. It was characterized like PVP by its HA activity, cytopathic effect in PK15 cell culture, and it was resistant to 20% ether and stable at p H 3.0. The conclusion was that a high percentage of analysed fetuses were infected with PVP, and the detection of virus antigen by HA, presents higher titles in fetuses younger than 65 days (17 cm length).

Key words: cell culture, diagnostic, haemagglutination, pigs, reproduction, virus.

Referencias

- Arcila MC, Henao CO, Molina S. Diagnóstico serológico de la parvovirus porcina en granjas del municipio de La Unión (Antioquia). 1995. Rev Col Cienc Pec. 1996;9 supl:24-26.
- Bachmann PA, Hoggan MD, Melnick J, Pereira HG, Vago C. Parvoviridae. Intervirology. 1975;5:83-92.
- Bane DP, James JE, Gradil CM, Molitor TW. In vitro exposure of preimplantation porcine embryos to porcine parvovirus. Theriogenology. 1990;33:553-561.
- Belak S; Rivera E, Ballagi Pordany A, Hanzhong W, Widen F et al. Detection of challenge virus in fetal tissues by nested PCR as a test of the potency of a porcine parvovirus vaccine. Vet Res Com. 1998;22:139-146.
- Choi CS, Joo HS, and Molitor TW. Replication of two porcine parvovirus isolates at non permissive temperatures. Arch Virol. 1990;113:244 -255.
- Choi CS, Joo HS, Molitor TW. Inhibition of porcine parvovirus infection by empty particles. Arch Virol. 1987;96:75-87.
- Christianson WT. Stillbirths, mummies, abortions and early embryonic death. Vet Clin N Am. Food An Prac. 1992;8:623-639.
- Clark LK. Epidemiology and management of selected swine reproductive diseases. Animal Reprod. Sci. 1996;42:447-454.
- Cutler RS, Molitor TW, Leman AD. Farm studies of porcine parvovirus infection. J Am Vet Med Assoc. 1983;182:592-594.
- Detección de la actividad viral del parvovirus porcino en fetos de cerdas gestantes de sacrificio. En: Manual de enfermedades porcinas Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario ICA, Asociación Colombiana de Porcicultores, Fondo Nacional de la Porcicultura, 2000; 117-124.
- Falcon A, Rodríguez M, Batalla D, Camacho J, Hernández E, et al. Aislamiento de Parvovirus porcino de fetos momificados. Tec Pec Mex. 1988; 6:185-191.
- Foni E, Gualandi GL, Capucci L. Characterization of a parvovirus isolated from a pig fetus. Microbiologica. 1989; 12:277-280.
- Gardner IA, Carpenter TE, Leontides L and Parsons TD. Financial evaluation of vaccination and testing alternatives for control of parvovirus - induced reproductive failure in swine. J Am Vet Med Assoc. 1996;208:863-869.
- González D. Aislamiento e identificación de parvovirus a partir de fetos porcinos. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1985; 15p.
- González G. Torres M. Parvovirus : causa de problemas reproductivos en la pira. Porc Col. 1992;23:18-19, 22-23.
- González G. Torres M. Serología de las infecciones por Pseudorabia y parvovirus en pira de ceba de Antioquia y mixtas del valle del Cauca. Rev ICA. 1987;22:70 -74.
- González G. Torres M. Evidencias serológicas de infección por parvovirus en cerdos de sacrificio. Rev ICA. 1986;21:80 -85.
- Gradil C, Molitor T, Harding M, Crabo B. Excretion of porcine parvovirus through the genital tract of boars. Am J Vet Res. 1990;51:359-362.
- Hill H. Interpretation of serologic results of some important swine diseases. Comp Cont Ed Pract Vet. 1988;10:979 -985.
- Huysman C, Vanleengoed L, Jong M and Osta A. Reproductive failure associated with porcine parvovirus in an enzootically infected pig herd. Vet Rec. 1992;131:503-506.

21. Johnson RH. Isolation of swine parvovirus in Queensland. *Aust Vet J.* 1973;40:157.
22. Johnson RH, Donaldson CR. Observations on the epidemiology of porcine parvovirus. *Aust Vet J.* 1976;52:80-84.
23. Joo HS, Donaldson CR and Johnson RH. Rapide diagnostic techniques for detection of porcine parvovirus infection in mummified fetuses. *Aust Vet J* 1976;52:51.
24. Joo HS, Donaldson CR, and Johnson RH. A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. *Aust Vet J.* 1976;52:422-424.
25. Mengeling WL. Porcine parvovirus. En: Leman AD, Straw B, Mengeling WL, eds. *Diseases of swine.* 7 ed. Ames: Iowa State University, 1992 ;299-311.
26. Mengeling WL. Porcine parvovirus. En: Pensaert MB. *Virus infections of porcines.* Amsterdam: Elsevier Sciences, 1989 ;81- 94.
27. Mengeling WL. Parvovirus porcine: induced failure reproductive. En: Howard JL. *Current veterinary therapy: food animal practice,* 1986 ;,539-540.
28. Mengeling WL. Características y control de la PVP en la producción porcina. II Curso internacional de producción porcina. Medellín: COLVEZA, 1983 ;13p.
29. Mengeling WL. Prevalence of porcine parvovirus - induced reproductive failure: an abattoir study. *J Am Vet Med Assoc*1978;172:1291-1294.
30. Mengeling WL. Porcine parvovirus: frequency of naturally occurring transplacental infection and viral contamination of fetal porcine kidney cell cultures. *Am J Vet Res* 1975;36:41-44.
31. Mengeling WL, Paul PS, Lager KM. Virus induced maternal reproductive failure of swine. *J Am Vet Med Assoc* 1993;203:1268-1271.
32. Molina S, Bermúdez L, Gil P. Encuesta serológica de parvovirus en cerdos no vacunados y sacrificados en el matadero de Turbo. *Rev Col Cien Pec* 1999;12:30-35.
33. Molina S, Rueda H, Zuluaga D. Encuesta serológica de parvovirus en cerdos vacunados y sacrificados en el matadero del municipio de Andes. *Rev Col Cien Pec.* 1997;10, supl:34.
34. Molitor TW, Joo HS, Collett MS. KBSH parvovirus. Comparison to porcine parvovirus. *J Virol* 1985;55:257-263.
35. Ovaldia N. Outbreak of porcine parvovirus disease in Panama. *Tropl Anim Health Prod.* 1991;23:181-185.
36. Porcine Parvovirus. Vaccine introduced. *Vet Rec.* 1984; 114:108.
37. Rico S, Sierra J. Molina S. Evidencia serológica de parvovirus porcino en la hacienda El Progreso. I congreso nacional de porcicultura. Bogotá: ACOMVEC, 1995 ;47-50.
38. Rico S, Sierra J. Molina S. Parvovirosis porcina. *Porcinotas.* 1994;8:10-12.
39. Romero AA, Villamil LC, Mogollón JD. Aportes al estudio de parvovirus porcino. *Rev Med Vet Zoot Univ Nac Col.* 1995;63:29-36.
40. Shahrabadi MS, Lynch J, Cho HJ and Marusyk RG. Studies on the multiplication of a porcine parvovirus. *Vet Microbiol.* 1982;7:117.
41. Thacker BJ. Infectious reproductive diseases in swine. *Comp Cont Ed Pract Vet.* 1988;10:669-676.
42. Thacker BJ, Joo HS, Winkelman NL, Leman AD, Barnes DM. Clinical, virologic and histopathologic observations of induced porcine parvovirus infection in boars. *Am J Vet Res.* 1987;48:763-767.
43. Thacker BJ, Leman AD, Hurtgen JP. Survey of porcine parvovirus infection in swine fetuses and their dams at a Minnesota abattoir. *Am J Vet Res.* 1981;42:865-867.
44. Waldvogel AS, Broll S, Rosslopf M, Schwyzer M, Popischil A. Diagnosis of fetal infection with porcine parvovirus by in situ hybridization. *Vet Microbiol* 1995;47:377-385.